

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 58-067196

(43)Date of publication of application : 21.04.1983

(51)Int.Cl.

C12Q 1/26

G01N 33/50

(21)Application number : 56-163469

(71)Applicant : SHINOTESUTO KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 15.10.1981

(72)Inventor : NAITO MASAHIRO  
NAKANO YORITO

## (54) DETERMINATION OF TRIGLYCERIDES

## (57)Abstract:

PURPOSE: When glycerol-3-phosphoric acid oxidase is made to act on glycerol-3-phosphoric acid in the presence of oxygen, a combination of a surface active agent with a buffer solution is used to determine the formed hydrogen peroxide.

CONSTITUTION: In the process that glycerol-3-phosphoric acid oxidase is made to act on glycerol-3-phosphoric acid originating from triglyceride in the presence of oxygen, a combination of polyoxyethylene 3,5,5-tetramethylhexanol as a surface active agent with a buffer solution is used. As the buffer solution, is used N, N-bis(2-hydroxyethyl)glycine, 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, N-tris-(hydroxymethyl)methylglycine or glycylglycine.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑬ 日本国特許庁 (JP)  
⑭ 公開特許公報 (A)

⑮ 特許出願公開  
昭58—67196

⑯ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 Q 1/26  
G 01 N 33/50

識別記号

庁内整理番号  
6543—4B  
6422—2G

⑰ 公開 昭和58年(1983)4月21日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑱ トリグリセライドの定量方法

⑲ 特 願 昭56—163469  
⑳ 出 願 昭56(1981)10月15日  
㉑ 発 明 者 内藤正宏  
相模原市相武台団地 1—1—6

—46  
㉒ 発 明 者 中野頼人  
相模原市大野台 4—15—16  
㉓ 出 願 人 株式会社シノテスト研究所  
相模原市大野台 2—29—14

明 細 書

1. 発明の名称

トリグリセライドの定量方法

2. 特許請求の範囲

- (1) グリセロール—8—リン酸に酸素の存在下  
グリセロール—8—リン酸酸化酵素を作用せ  
しめて生成する過酸化水素を定量する方法に  
おいて、界面活性剤としてポリオキシエチレ  
ン 8 , 5 , 5—テトラメチルヘキサノール及  
びグッド緩衝液を併用することを特徴とする  
トリグリセライドの定量方法。
- (2) グッド緩衝液として N , N—ビス ( 2—ヒ  
ドロキシエチル ) グリシン、8— ( N—モル  
ホリノ ) プロパンスルホン酸、N—トリス—  
( ヒドロキシメチル ) メチルグリシン又はグ  
リシルグリシンを使用する、特許請求の範囲  
第 1 項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はトリグリセライドの定量方法に関す

る。

さらに詳しくは、トリグリセライドに由来す  
るグリセロール—8—リン酸に酸素の存在下グ  
リセロール—8—リン酸酸化酵素を作用せしめ  
て生成する過酸化水素を定量する方法において、  
界面活性剤としてポリオキシエチレン 8 , 5 ,  
5—テトラメチルヘキサノール ( 以下 POETMH  
と記す ) 及びグッド緩衝液を併用することを特  
徴とするトリグリセライドの定量方法に関する  
ものである。

血清中のトリグリセライドの定量は高脂血症、  
動脈硬化症等の検査のひとつとして臨床的に重  
要となっており、その定量法は従来より種々開  
発されている。

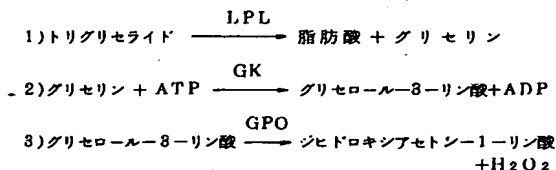
就中、グリセロール—8—リン酸酸化酵素を  
用い生成する過酸化水素をパーオキシダーゼの  
存在下で発色させ、これを比色定量する方法が  
ある。( 臨床検査・機器・試薬、8 巻、3 号、  
272 頁、1980 年 ) しかし、この方法は緩衝液  
にトリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩

特開昭58-67196(2)

及び界面活性剤にポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル（商品名トライトンX-100）等を使用しているため、酵素反応に長時間を要するうえ、発色剤のm-メトキシジメチルアニリンの発色感度が低い欠点がある。

かかる課題は、従来法における酵素の使用量を変えることなく酵素反応を短時間に終了させなければ意味をもたない。酵素反応速度に界面活性剤と緩衝液とが大きく関与することに鑑み、本発明者らはそれらについて種々検討した結果、グッド緩衝液に界面活性剤としてPOETMHを併用すれば酵素反応時間が著しく短縮することを見出し本発明を完成した。

即ち、本発明は次の反応式を基礎として、



※ LPL = リボプロテインリパーゼ

下で4-アミノアンチピリンと酸化縮合反応を起こし、 $\lambda = 550\text{nm}$  附近に極大吸収をもつキノン型色素を形成する。この際の発色感度は、m-メトキシジメチルアニリンに対して約1.3倍以上の効果が得られ、呈色の安定性も極めて良好である。

本発明で用いる発色剤は上記以外で例えば、アニリン系のN-(2-カルボキシエチル)-3-メチルアニリン、N-(2-カルボキシエチル)-N-エチルアニリン、N-(2-カルボキシエチル)-N-メチルアニリン、N-エチル-N-(2,8-ジヒドロキシプロピル)-3-メチルアニリン、N-(2,8-ジヒドロキシプロピル)アニリンなどを使用することができる。

酵素反応系にグッド緩衝液及び界面活性剤としてPOETMHを用いる本発明法による反応速度はトリス緩衝液及びトライトンX-100に対して、同一の酵素量で反応終了まで約1/3の時間に短縮が可能になる。

GK = グリセロールキナーゼ

GPO = グリセロール-3-リン酸化酵素

ATP = アデノシン三リン酸

ADP = アデノシン二リン酸

上記式3)の反応工程によつて生成する過酸化水素を定量する方法において、界面活性剤としてPOETMH及びグッド緩衝液を併用するトリグリセライドの定量方法である。

本発明に用いるグッド緩衝液はN,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン（以下、BICINEと記す）、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸（以下、MOPSと記す）、N-トリス-(ヒドロキシメチル)メチルグリシン（以下、TRICINEと記す）又はグリシルグリシンであるが、いずれを用いても本発明の効果には変りはない。

本発明の発色剤は、N-(2-カルボキシエチル)-N-エチル-3-メチルアニリンを用いる。この発色剤は一連の酵素反応の結果、生成される過酸化水素をパーオキシダーゼの存在

これらの比較実験による結果は第1表のとおりである。

第1表

|     | 試 薬 条 件  |         |            | 結 果     |      |        |
|-----|----------|---------|------------|---------|------|--------|
|     | 発色剤      | 緩衝液     | 界面活性剤      | 反応時間(分) | 発色感度 | 呈色の安定性 |
| 従来法 | m-MeODMA | トリス     | トライトンX-100 | 11      | 0.19 | 985    |
|     | CEMB     | BICINE  | POETMH     | 8.9     | 0.25 | 100    |
|     | "        | MOPS    | "          | 4       | "    | 95     |
|     | "        | TRICINE | "          | 8.9     | "    | 95.6   |

上記表中m-MeODMAはm-メトキシジメチルアニリン、CEMBはN-(2-カルボキシエチル)-3-メチルアニリン、トリスはトリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩を要し、反応時間は反応終了に要した時間で、発色感度はトリグリセライド250mg/dlの溶液20μlを測定液30μlで呈色させた時の $\lambda = 550\text{nm}$ での光路長1cmの吸光度で、呈色の安定性は250分後の呈色のスタート時に対する比率をみたものである。

尚、酵素量は血清サンプル1検体分につき1

特開昭58-67196(3)

ポブロテインリパーゼ400IU、グリセロールキナーゼ02IU、グリセロール-8-リン酸化酵素55IUを37℃でインキュベーションした時に相当するものである。

以下、本発明を実施例によって説明する。

#### 実施例1

##### (1) 試薬の調製

###### ① 測定液

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| リボプロテインリパーゼ                  | 132820IU |
| グリセロールキナーゼ                   | 6666 IU  |
| グリセロール-8-リン酸化酵素              | 1888IU   |
| パーオキシダーゼ                     | 1500IU   |
| 4-アミノアンチピリン                  | 140 mg   |
| アデノシン <sup>三</sup> リン酸二ナトリウム | 435 mg   |
| 塩化マグネシウム六水塩                  | 88g      |
| POETMH                       | 4 g      |
| CEMB塩酸塩                      | 2487mg   |

上記試薬を50mM N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン緩衝液(pH7.6)で全量1,000mlになるように溶解する。

###### ② 標準液

グリセリン0026gを蒸留水に溶解し、全量100mlとする。

##### (2) 試験方法

試験管に血清20μlを取り、これに調製した①の測定液を80ml加え、混合後37℃で5分間加温し発色させる。同時に蒸留水(試薬ブランク用)及び標準液を用いて同様の操作を行なう。発色後、波長550nmで吸光度を測定し下記の式よりトリグリセライド値を求める。

$$TG値(mg/dl) = \frac{\text{検体O.D} - \text{試薬ブランクO.D}}{\text{標準液O.D} - \text{試薬ブランクO.D}} \times 250$$

O.D = 吸光度, TG = トリグリセライド

特許出願人 株式会社 シノテスト研究所